

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年3月6日 (06.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/018808 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/29, 15/82, 5/14
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/08739
- (22) 国際出願日: 2002年8月29日 (29.08.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-264156 2001年8月31日 (31.08.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市広沢 2番1号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松井 南 (MAT-SUI, Minami) [JP/JP]; 〒230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町 1丁目7番22号 理化学研究所 横浜研究

所内 Kanagawa (JP). 市川 尚斉 (ICHIKAWA, Takanari) [JP/JP]; 〒230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町 1丁目7番22号 理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 中澤 美紀 (NAKAZAWA, Miki) [JP/JP]; 〒230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町 1丁目7番22号 理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 関 原明 (SEKI, Motoaki) [JP/JP]; 〒305-0074 茨城県 つくば市 高野台3丁目1番地の1 理化学研究所 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 藤田 美紀 (FUJITA, Miki) [JP/JP]; 〒305-0074 茨城県 つくば市 高野台3丁目1番地の1 理化学研究所 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 篠崎 一雄 (SHINOZAKI, Kazuo) [JP/JP]; 〒305-0074 茨城県 つくば市 高野台3丁目1番地の1 理化学研究所 筑波研究所内 Ibaraki (JP).

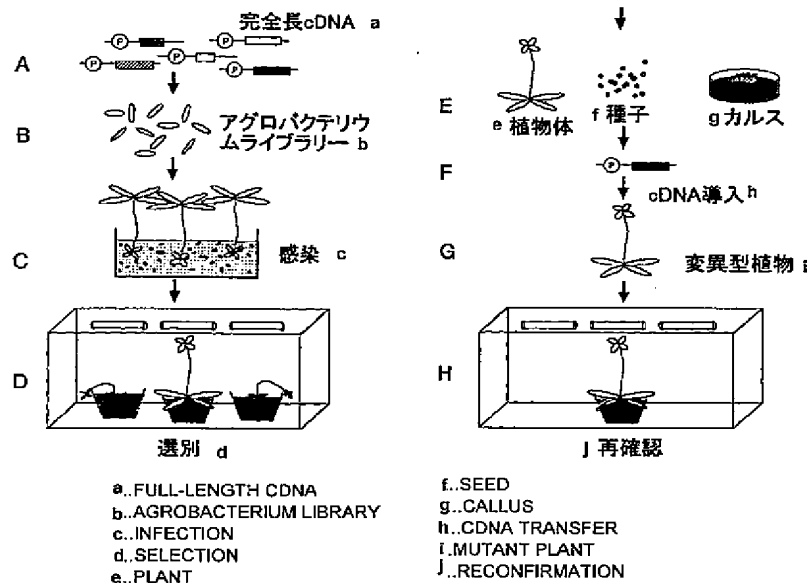
(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都 港区 虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

[続葉有]

(54) Title: PLANT SYSTEM FOR COMPREHENSIVE GENE FUNCTION ANALYSIS WITH THE USE OF FULL-LENGTH cDNA

(54) 発明の名称: 完全長cDNAを用いた総合的遺伝子機能解析の植物システム



(57) Abstract: A gene causative of a phenotype character is easily specified and thus gene functions are comprehensively analyzed. A method of analyzing a gene function which comprises: (a) infecting a plant mass with a full-length cDNA library containing an expression regulatory sequence to thereby transfer the cDNA into the plants; (b) individual plants fulfilling desired requirements are selected from the plants having the cDNA transferred thereinto as described

[続葉有]



DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

above; (c) isolating the above-described cDNA from the selected plants; and (d) re-transferring the thus isolated cDNA into a plant of the same species as the transgenic plants as described above to thereby reconfirm the phenotype character depending on the selection requirements as described above.

(57) 要約:

表現形質の原因遺伝子の特定が容易で、遺伝子機能を網羅的に解析する。

(a) 発現調節配列を含む完全長 cDNA のライブラリーを植物集団に感染させて該 cDNA を植物に導入し、(b) 前記 cDNA が導入された植物集団から目的の選抜条件に適合する植物を選抜し、(c) 前記選抜された植物から前記 cDNA を単離し、(d) 前記単離された cDNA を、前記導入された植物と同種の植物に再導入して前記選抜条件により表現形質を再確認することを含む遺伝子機能の解析方法。

明 細 書

完全長 cDNA を用いた総合的遺伝子機能解析の植物システム

技術分野

本発明は、完全長 cDNA を用いた総合的遺伝子機能解析の植物システムに関する。

背景技術

遺伝子の機能を解析するには、遺伝子に点突然変異を導入したり、挿入又は欠失変異を導入する方法が通常使われている。点突然変異の導入にはゲノム全体を変異誘導試薬によって化学的に処理する方法が一般的である。しかしながら、この方法は、変異の導入は簡単であるが、数億というゲノム DNA を構成する塩基配列の中から 1 つの塩基置換を検索しなければならず、その同定には多くの時間が必要とされる。従って、数万ある遺伝子の機能同定を高速かつ網羅的に決定するには不向きといえる。

そこで、高効率に遺伝子に変異を導入し、かつ、短時間に遺伝子機能を調べる方法として、遺伝子タギング法が知られている。この方法は、既知の遺伝子断片(タグ)を無作為にゲノム中に挿入し、挿入部位の遺伝子機能を破壊するというものである。植物の場合、この遺伝子タグには、T-DNA やトランスポゾンが使用される(Krysan, P. J. ら、Plant Cell, 1999. 11(12): p. 2283-90; Speulman, E. ら、Plant Cell, 1999. 11(10): p. 1853-66)。T-DNA の場合はアグロバクテリウムを介した植物への感染によって、また、トランスポゾンの場合はトランスポゼースを持った植物との掛け合わせによって、遺伝子断片はゲノム中に無作為に挿入される。そして、T-DNA は、通常 1 つの植物個体あたり 1~2 コピーくらいの頻度で挿入され (Azpiroz-Leehan, R. ら、Trends Genet, 1997. 13(4): p. 152-6)、ある種のトランスポゾンの場合は、ほぼ 1 コピーのトランスポゾンがゲノム中に挿入される (Fedoroff, N. ら、Bioessays, 1995. 17(4): p. 291-7)。このような挿入変異株を数万用意することで、各々の遺伝子の機能を破壊した植物株の集団を作製することができる。

目的の変異形質を示す植物を単離した後に、変異形質と遺伝子との関係を調べる場合は、導入した遺伝子断片を手がかりに、PCR 等の手法によって挿入部位近傍の遺伝子情報を得ることができるため、遺伝子の機能同定を高速かつ網羅的に行うことができる (Krysan, P. J. ら、Plant Cell, 1999. 11(12): p. 2283-90; Speulman, E. ら、Plant Cell, 1999. 11(10): p. 1853-66)。

この遺伝子タギング法の発展型としてアクチベーションタギング法と呼ばれる手法が知られている。アクチベーションタギング法とは、T-DNA 内に組み込まれた転写のエンハンサー配列を利用して、T-DNA が挿入されたゲノムの近傍に存在する遺伝子の転写活性化を起こさせるというものであり、近年、新しい植物遺伝子機能の解析法として発達してきた (Walden, R. ら、Plant Mol Biol, 1994. 26(5): p. 1521-8)。このアクチベーションタギングが持つ特徴のうち最も重要と思われるものは、タグによって優性の突然変異をも作ることができるという性質である。すなわち、他の遺伝子が重複機能をもつタイプ（例えばジーンファミリーを形成する遺伝子群）の遺伝子の変異に起因する表現型をも観察することができるという点である。この性質は、従来の遺伝子破壊型の突然変異体作成からは決して観察されてこなかったものである。

しかし、この様なアクチベーションタギング法を網羅的な遺伝子機能の解析（ゲノムに存在する遺伝子の機能をまとめて解析すること）に用いるにはひとつの大きな問題がある。それは、タグ内部のアクチベータとしてエンハンサー配列が用いられているため、転写活性化可能なゲノム領域は挿入部位前後 5kb (Weigel, D. ら、Plant Physiol, 2000. 122(4): p. 1003-13) にも及ぶことである。シロイヌナズナのようなモデル植物では、10kb のゲノム領域の中には平均 2 個以上の遺伝子が存在するため、エンハンサーによってどの遺伝子が活性化されたのかを判断することが困難である。従って、原因遺伝子の特定にはこれら挿入部位近傍の遺伝子をすべて単離して再度形質転換を行い、強制発現させて表現型が再現することを確認することによって、どの遺伝子とその表現型を規定するために機能していたのかを調べることが不可欠である。このことは、目的の形質を示す植物の単離から、原因遺伝子の特定まで平均して年単位の解析が必要になることを意味している。従って、アクチベーションタギング法を網羅的なゲノム遺伝子機能解析に

用いようとする、得られる遺伝子種や表現型の新規性は認められるにもかかわらず、従来の遺伝子破壊型タイプのタギングで見られるような遺伝子特定の迅速性、網羅的解析への適応性というメリットが見られないという大きな矛盾が生じる。

本発明は、表現形質の原因遺伝子の特定が容易で、遺伝子機能を網羅的に解析することが可能な、次世代型アクチベーションタギングシステムを提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、完全長 cDNA と、植物細胞内で恒常的又は条件的に発現を誘導することができるプロモーターとを含む T-DNA ベクターを有するアグロバクテリウムを植物集団に導入し、上記完全長 cDNA を過剰に発現させ、形質転換された植物体の表現形質を確認することにより遺伝子機能を網羅的に解析することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 遺伝子機能の解析方法であって、以下の工程：

(a) 発現調節配列を含む完全長 cDNA のライブラリーを植物集団に感染させて該 cDNA を植物に導入し、

(b) 前記 cDNA が導入された植物集団から目的の選抜条件に適合する植物を選抜し、

(c) 前記選抜された植物から前記 cDNA を単離し、

(d) 前記単離された cDNA を、前記導入された植物と同種の植物に再導入して前記選抜条件により表現形質を再確認すること、を含む前記解析方法。

(2) 遺伝子機能の解析システムであって、以下の手段：

(a) 発現調節配列を含む完全長 cDNA のライブラリーを植物集団に感染させて該 cDNA を植物に導入する手段、

(b) 前記 cDNA が導入された植物集団から目的の選抜条件に適合する植物を選抜する手段、

(c) 前記選抜された植物から前記 cDNA を単離する手段、及び

(d) 前記単離された cDNA を、前記導入された植物と同種の植物に再導入して前記選抜条件により表現形質を再確認する手段、
を含む前記解析システム。

上記解析方法及び解析システムにおいて、発現調節配列としては恒常発現型プロモーター、誘導型プロモーター又はこれらの組合せが挙げられる。また、完全長 cDNA ライブラリーとして、アグロバクテリウムに導入されたものを使用することができる。この場合、cDNA を植物に導入するには、アグロバクテリウムの感染により行われる。

さらに、選抜条件としては、形態形成変異及び/又はストレス耐性によるものが挙げられる。ストレスとしては、貧栄養ストレス、乾燥ストレス、温度ストレス（低温ストレス又は高温ストレス）、強光ストレス、紫外線ストレス、塩ストレス、大気汚染ストレス、農薬ストレス、酸化ストレス、重金属ストレス、病害ストレス及びホルモンストレスからなる群より選択される少なくとも 1 つを例示することができる。

(3) 前記解析方法により解析された機能を有する遺伝子を含む植物。

上記植物には、植物体、種子、カルス及びプロトプラストからなる群より選択されるいずれかのものが含まれる。

本発明は、完全長 cDNA を植物集団に導入し、当該植物集団について、その後の表現形質を確認することで、個々の植物ごとに遺伝子解析することなく遺伝子機能を植物群ごとにまとめて解析しようとする方法である。本発明者らは、この方法を、「Fox Hunting System」 (Full length cDNA over-expression gene hunting system) と名付けた。その手法を以下に説明する (図 1)。

(1) 完全長 cDNA ライブラリーの調製手段 (図 1A)

本発明において使用する完全長 cDNA とは、mRNA の完全なコピーを意味し、得られた cDNA よりも長い cDNA が存在する場合でも本発明における完全長 cDNA に含めることとする。

完全長 cDNA ライブラリーは、遺伝子が機能するときに必要な全アミノ酸情報を含むため、導入する遺伝子が本来有する全機能を発揮することができる。従って、

通常の cDNA ライブラリーに比べ、機能発現の効率が遙かに高く、また、全ての cDNA 断片が本来の開始コドン及び停止コドン情報を備えているため、発現のためのタンパク質融合化などの必要がなく、タンパク質発現効率が高い。

このような完全長 cDNA は、当業者には公知の方法により、目的の mRNA から効率よく調製することができる。mRNA の 5' 末端には、7-メチルグアノシンが 5', 5' 三リン酸結合によって付加されており、これに着目していくつかの完全長 cDNA 合成技術が開発されている。例えば、Cap-trapper 法 (Carninci, P., ら、Genomics, 1996. 37(3):p. 327-36)、Cap-finder 法 (Zhao, Z., ら、J. Biotechnol., 1999. 73(1):p. 35-41) 等の手法を使用することができるが、これらに限定されるものではない。

完全長 cDNA をクローニングするためのベクターとしては、SfiI のような、8 塩基以上を認識し、かつ、挿入 DNA の方向を一方向に規定できる制限酵素部位を、cDNA 挿入部位の両側に持つものを用いるのがよい。

当業者に公知の手法を利用して、上記の完全長 cDNA を担持する完全長 cDNA ライブラリーを調製することができる。ライブラリーを調製するためのベクターとして、pTAS、pBig などが挙げられる。

また、本発明の方法において使用する完全長 cDNA ライブラリーは、種々の生物に由来する mRNA を用いて調製することができる。例えば、シロイヌナズナ、トマト、イネ、トウモロコシなどの有用植物の cDNA のほか、酵母、植物病原菌などの mRNA から cDNA を合成することができる。

植物は、非常に簡単に形質転換体クローンを作り出せる高等生物である。その形質転換体は、種子という資源を作製するのに適している。従って、完全長 cDNA ライブラリーは植物から調製することが好ましい。

更に都合の良いことに、何億クローンものライブラリーに感染させても、1 植物には 1~2 クローンしか導入されないので、形質転換植物体は、すべて別々のクローンが導入されることになる。

一方、高等動物細胞は、高等植物細胞と同様に様々な膜構造によって細胞内が仕切られており、その構造の維持、又は細胞内シグナル伝達の仕組みには驚くほどの類似性が見出されている。従って、完全長 cDNA ライブラリーは動物に由来す

る mRNA から調製することもできる。このことは、高等動物由来の完全長 cDNA を高等植物に導入することによって、高等植物遺伝子と共通する動物遺伝子の機能を同定することも可能であることを意味する。シロイヌナズナの遺伝子は、ヒトの遺伝子と高い相同性を示すものが多数認められている。例えば、これまでに同定されたヒト遺伝病の原因遺伝子 289 個のうち 169 個の遺伝子に類似した遺伝子は、シロイヌナズナのゲノム上に存在し、相同性が高いことがわかっている（田畑、化学と生物、Vol. 39, No. 6, 2001）。

ところで、従来の cDNA ライブラリーでは、全ての mRNA 分子がそのままの量比で cDNA 分子に置き換わるため、発現量の多い構造タンパク質遺伝子群などがライブラリー内の分子の大半を占め、情報伝達に関連する遺伝子のような、通常は発現量が少ない遺伝子群はライブラリー中における割合が極端に少ないことが多い。従って、遺伝子の発現量によって各 cDNA クローンの存在比が大きく異なる。そこで、遺伝子の発現量にかかわらず全てのクローンが同一の割合で含まれるようにライブラリーを作製することが好ましい。このようなライブラリーを作製することを「標準化」という。

この完全長 cDNA を、各クローンにつき等量ずつ混合すれば、標準化完全長 cDNA 混合物を得ることができる。合成された完全長 cDNA の 5' 末端配列と 3' 末端配列を決定して、重複の無い（末端部における一部の領域の配列が共通しない）完全長 cDNA クローンを選別し、これをデータベース化しておく。

標準化された完全長 cDNA ライブラリーは、それぞれ互いに異なる cDNA を選別した上で等量ずつ混合したものであり、従来の cDNA ライブラリーが有する分子種の不均一性はなく、全体的に均一である。従って、ゲノム遺伝子の多コピー遺伝子群をも考慮すると、ゲノムをタギングするときよりも公平に、すなわち高効率に、別種遺伝子の機能検定を行うことができる。

また、シロイヌナズナでは全ゲノムの 50% 以上に相当する標準化完全長 cDNA が現在整備されており、ヒトの遺伝子に関しては既に約 80% 以上もの標準化完全長 cDNA が存在する。有用植物のイネでも同様のリソースが整備されつつある。従って、本発明においては、これらの整備された標準化完全長 cDNA を使用することもできる。

但し、本発明の方法においては、完全長 cDNA ライブラリーの標準化は必ずしも必要ではない。標準化をするか否かについては、対象とする生物のゲノム情報について知られている程度、あるいは対象とする遺伝子の予想される発現量などの各種因子及び費用等から、当業者が適宜決定することができる。例えば、構造タンパク質の機能を解析したい場合には、これらの遺伝子は多量に発現していると考えられるので、通常の完全長 cDNA ライブラリーでも十分に使用することができる。

(2) 発現ベクターへの完全長 cDNA のクローニング手段 (図 1 B)

得られた完全長 cDNA 又は標準化完全長 cDNA を、アグロバクテリウム・チューメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) による植物形質転換のための T-DNA 発現ベクターにクローニングすることができる。T-DNA とは、双子葉植物の腫瘍であるクラウンガールの病原細菌であるアグロバクテリウムの病原性株に見出される Ti プラスミドが有する特定領域であり、この細菌が植物に感染すると、T-DNA が植物細胞に転移し、ゲノム DNA 中に組み込まれる。

この T-DNA の内部には、完全長 cDNA の発現を調節するための配列が含まれる。発現調節配列としては、植物細胞内で、恒常的に若しくは条件的に発現を引き起こすプロモーター配列と、ターミネーターが連結したカセットを組み込むのが好ましい。好ましい恒常発現型プロモーター配列としては、カリフラワーモザイクウイルス (Cauliflower Mosaic Virus) の 35S プロモーター配列 (Sanders, P.R. ら、Nucleic Acids Res, 1987. 15(4): p. 1543-58) が挙げられ、誘導型プロモーターとしてはグルココルチコイド誘導型プロモーター配列 (Aoyama, T. ら、Plant J, 1997. 11(3): p. 605-12)、エストロゲン誘導型プロモーター配列 (Zuo, J et al, Plant J, 2000. 24(2): pp 265-273) などが挙げられる。本発明においては、これらのプロモーターを任意に組み合わせて(連結して)使用することも可能である。プロモーターの組合せは、恒常発現型又は誘導型同士でもよく、両者を組合せたものでもよい。

上述の完全長 cDNA 又は標準化完全長 cDNA をそのプロモーター配列の下流にセンス方向、又はアンチセンス方向になるように、酵素反応により挿入する。これ

により、センス鎖を発現させた場合は、当該 cDNA をコードする遺伝子の過剰発現をもたらす表現形質の変化を、アンチセンス鎖を発現させた場合は、当該 cDNA をコードする遺伝子の過少発現をもたらす表現形質の変化を知ることができる。

(3) 完全長 cDNA ライブラリーの植物への導入手段 (図 1 C)

次に、この完全長 cDNA が挿入された T-DNA の集団 (Full-length cDNA over-expressor library; FOX library) を常法によりアグロバクテリウムに導入し、ライブラリーを作製した後、そのライブラリー中の cDNA を、アグロバクテリウムによる感染を介して植物に導入 (形質転換) する。

アグロバクテリウムを感染させる対象となる植物は、双子葉植物及び単子葉植物のいずれでもよい。但し、単子葉植物を用いる場合は、効率的にアグロバクテリウムを感染させるためにフェノール化合物 (アセトシリニンゴン) を培地に添加することが好ましい。

上記植物は、植物体全体、植物器官 (例えば葉、花卉、莖、根、種子等)、植物組織 (例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等) 又は植物培養細胞 (プロトプラスト及びカルスを含む) のいずれをも意味するものである。

形質転換に用いられる植物としては、アブラナ科、イネ科、ナス科、マメ科等に属する植物 (下記参照) が挙げられるが、これらの植物に限定されるものではない。

アブラナ科: シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)

ナス科: タバコ (*Nicotiana tabacum*)

イネ科: トウモロコシ (*Zea mays*)、イネ (*Oryza sativa*)

マメ科: ダイズ (*Glycine max*)

植物へのアグロバクテリウムの感染は、ディッピング法などを用いることができる。ディッピング法の場合は、植物体の束を、アグロバクテリウムが含まれる液体中に 30~60 秒浸漬する。必要により、組織培養をした細胞に共感染 (コカルチャー) させてもよい。

ライブラリー中の個々のアグロバクテリウムは、それぞれ別々の cDNA が挿入されたベクター (T-DNA) を有しており、T-DNA は、通常 1 植物個体に 1~2 コピー

しか挿入されない。従って、このような形質転換植物の集団は、全て別々の 1~2 個の完全長 cDNA を強発現しうる植物クローンの集団であると言える。このような植物個体の集団の中から、目的の変異体を次に示すいくつかの手法で選抜する。

(4) 表現形質による選抜手段 (図 1D)

過剰発現 cDNA が導入された植物集団を T1 世代で抗生物質耐性によって選抜すると同時に、種々のストレス耐性項目を付加することで、生き残る(適応した)変異株のみを選択することができる(テラーメードスクリーニングと呼ぶ)。

また、野生型の植物を組織培養してできるカルスに、上記のアグロバクテリア FOX ライブラリーを、コカルチャー法によって感染させる方法も採用することができる。組織培養によるコカルチャー法を採用すれば、形質転換の選抜と、表現形質の選抜とを同時に行うことができ、ディッピングによる形質転換効率が悪い植物種であってもそのような植物を形質転換材料として利用することが可能である。

上記選抜方法によれば、完全長 cDNA を含んだ植物集団を一度すべて揃えるという「ライン化」をすることなく、ライブラリー内の全ての遺伝子機能検索をひとまとめにして行うことにより、簡単に目的の変異体を得ることができるため、僅かな労力で特定の性質を付与する遺伝子(本来その遺伝子が有している機能であるか否かを問わない)のスクリーニングを行うことができる。

さらに、アグロバクテリウムの FOX ライブラリーを用いて植物を形質転換し、この形質転換植物から種子を回収した後、抗生物質耐性となった形質転換体の全てを生育させて各々の植物から種子を回収すれば、この種子の集団(種子ライブラリー)は様々な表現形質を指標としたスクリーニングのための材料となる。

表現形質による目的の植物は、種々のストレスに対する耐性、形態変異、環境応答変異、二次代謝産物変異など、様々な選抜条件によって単離することができる。この場合において、植物には植物体、種子、カルスなどが含まれる(図 1E)。

ストレスとしては、例えば、貧栄養ストレス、乾燥ストレス、温度ストレス(低温ストレス又は高温ストレス)、強光ストレス、紫外線ストレス、塩ストレス、大気汚染ストレス、農薬ストレス、酸化ストレス、重金属ストレス、病害ストレス及びホルモンストレスなどが挙げられ、これらのストレスは単独でも複数組み合

わさったものでもよい。

「貧栄養ストレス」とは、土壤栄養の主要成分である窒素、リン酸、カリウムのうち少なくとも1つの成分が欠けるか、あるいは通常必要とされる量の50%以下に減少することによって生じるストレスを意味する。

「乾燥ストレス」とは、水が枯渇した状態が持続的又は一時的に負荷されたときのストレスを意味する。

「温度ストレス」とは、植物生育の至適温度から上昇又は下降した状態に置かれることを意味する。例えば、「高温ストレス」は、42℃以上の条件を数分以上、持続的又は一時的に負荷したときのストレスであり、「低温ストレス」は、-4℃以下の条件を数分以上、持続的又は一時的に負荷したときのストレスである。

「強光ストレス」とは、光合成能を超える強光が植物に照射された状態を意味し、例えば1000～2000 $\mu\text{mol/s/m}^2$ 以上の光を照射した場合が該当する。

「紫外線ストレス」とは、100～400nmの波長を有する紫外線を1～10mJ/cm²分以上照射した状態に置かれることを意味する。

「塩ストレス」とは、土壤に蓄積した塩類により土壤の水分ポテンシャルが低下して植物体が水分を吸収できなくなるなど、植物体の生理機能に損傷を与えるときのストレスを意味する。例えば、乾燥地帯における灌漑にともなう塩害によるストレスが挙げられる。

「大気汚染ストレス」とは、大気汚染物質（オゾン、二酸化硫黄、COX、など）が持続的又は一時的に負荷されたときのストレスを意味する。

「農薬ストレス」とは、植物体が農薬に持続的又は一時的に接触したときのストレスを意味する。

「酸化ストレス」とは、活性酸素によるストレスを意味する。

「重金属ストレス」とは、アルミニウム、銅、亜鉛、ニッケル、マンガン、カドミウムなど、土壤中の重金属物質の濃度が高まることによって生じる生育阻害を意味する。

「病害ストレス」とは、ウイルス、かび、昆虫などによる害を受けたときのストレスを意味し、例えばいもち病、うどんこ病、赤さび病、青枯れ病、モザイク病、根腐れ病などが挙げられる。

「ホルモンストレス」とは、各種植物ホルモンや、環境ホルモンが、植物に引き起こす形態異常や、代謝異常を引き起こすときのストレスを意味する。

これらのストレス耐性植物は、植物にとって十分にストレスを示す条件（例えば1週間水を与えない、37℃以上で培養する等）において枯死等をせずに耐性を示す植物を選抜することにより作出することができる。

また、「形態変異」とは、正常な環境において、野生型植物と異なる形態形成を引き起こす変異を意味する。徒長した植物、矮化した植物、葉の大型化した植物、根のはりが良い植物などが形態変異を起こした植物に該当する。

「環境応答変異」とは、温度、光、重力など、植物が通常感知している、あらゆる環境シグナルの応答に生じた変異を意味する。発芽がしやすい又はしにくい種子をつくる植物、花芽がすぐできる又はできない植物、光や重力のある方向に曲がる又は曲がらない植物などが環境応答変異を起こした植物に該当する。

「二次代謝産物変異」とは、植物二次代謝産物のうち、全般、又はある特定の二次代謝産物の生産量が、増加又は減少した変異を意味する。ちなみに、多くの漢方薬の原料は、そのような変異を生じた特殊な植物を利用している。

ところで、完全長 cDNA の導入により植物が特定の表現形質を示すためには、いくつかの機構が考えられる。センス mRNA を発現させた場合、その強発現により正常タンパク質が平常時よりも多量に産生されるか、又は本来産生されない組織で産生されるために特定の表現形質が現れることが考えられる。また、センス mRNA によるサイレンシング効果により、正常タンパク質量が減少することによって特定の表現形質が現れることも考えられる。一方、アンチセンス mRNA の場合、正常タンパク質の発現量の減少により特定の表現形質が現れることが考えられる。ここで重要なことは、いずれの機構によって特定の表現形質が現れるとしても、本発明のシステムにおいては、優性又は半優性の表現形質として現れるということである。従って、表現形質の変化は、導入された完全長 cDNA に起因するものと考えることができる。

(5) 表現形質の再確認及び変異形質の原因となる遺伝子の同定手段（図 1F～H）

次に、単離された形質転換植物からゲノム DNA を抽出し、この DNA から、T-DNA

中に含まれるプロモーター配列とターミネーター配列の近傍の塩基配列情報をもとにプライマーを設計し、これを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、これらの転写制御領域に挟まれた cDNA を単離する(図 1F)。この cDNA を、再び上記と同様のプロモーター配列とターミネーター配列を持った T-DNA に挿入し、これを、先に単離された形質転換植物と同種の正常植物に再導入して(図 1G)、ストレス耐性を有する表現形質の再確認をする(図 1H)。そして、cDNA の配列決定を行うことにより、変異形質の原因となる遺伝子を同定することができる。

アグロバクテリウムによる完全長 cDNA の植物への導入において、完全長 cDNA が導入されるコピー数は 1 ～ 2 コピーであるため、cDNA の単離と表現形質の確認の工程は多くても 2 回で十分であり、作業の省力化及び効率化を図ることができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の完全長 cDNA を用いた遺伝子機能解析方法の概要を示す図である。

図 2 は、F03024 ラインの T1 植物体を撮像した写真である。

図 3 は、F03024 ラインの T2 植物体を撮像した写真である。

図 4 は、pBIG03024 を用いて再度、F03024 を導入して作出した T1 植物体を撮像した写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例 1〕 遺伝子機能解析

本実施例では、恒常発現型ベクター pBIG2113N (Taji, T. ら Plant J., 2002. 24(4): p. p. 417-426 及び Becker, D. ら Nucleic Acid Res., 1990. 18(1): p. 203) に SfiI クローニングサイトを導入した pBIG2113SF を用いて、主に形態異常などの目に見える表現型をひきおこす cDNA のスクリーニングを行った。

(1) 標準化完全長 cDNA ミックスの作成

シロイヌナズナから完全長 cDNA を CAPtrapper 法によって作成した。この cDNA を Lambda ZAP、あるいは Lambda pLC-1-B の SfiI 制限酵素部位によって挟まれる部位にクローニングした (Seki M. et al. Plant J., 15, 707-720 (1998))。ベクター配列を用いて cDNA の 5' 末端と 3' 末端の配列を読み、cDNA のグルーピングを行い、独立の 13,000 種クローンを同定した (Seki M. et al. Plant Physiol. Biochem. 39, 211-220 (2001))。次に、50ng/ μ l に調整した各クローンから 0.5 μ l を分取して 1 本のチューブに混ぜた。この混合液 1 μ l 分取し、20 μ l の Electric competent cell DH10B (Gibco BRL) に形質転換した。Amp が含まれた寒天培地上で生育した独立のコロニーを約 200,000 個混合し、そこからプラスミドを回収した。これを標準化完全長 cDNA ミックスと呼ぶ。

(2) FOX アグロバクテリアライブラリーの作成

2 μ g の標準化完全長 cDNA ミックスと、700 μ g の pBIG2113SF を混ぜてから同時に SfiI で完全に切断した。切断後イソプロパノール沈殿により濃縮し、8 μ l の水に溶かし 1 μ l の 10×バッファーと 1 μ l の T4 リガーゼを混ぜ、16°C で 1 昼夜反応させた。2 μ l の反応液を 40 μ l の Electric competent cell DH10B に混ぜて形質転換した。

カナマイシン (Km) が含まれた寒天培地上で生育した独立のコロニーを約 150,000 個混合し、そこからプラスミド回収をした。回収した 2 μ l のプラスミド液を、40 μ l の Electric competent *Agrobacterium* cell GV3101 に混ぜて形質転換した。Km が含まれ寒天培地上で生育した独立のコロニーを約 150,000 個 LB 液体培地に懸濁し、15% になるようグリセロールを加え、-80°C にて保存した。このグリセロール溶液を FOX アグロバクテリアライブラリーと呼ぶ。

(3) FOX ラインの作成

上記の FOX アグロバクテリアライブラリーを約 200,000 コロニー生育させ、ディッピング溶液に懸濁させた後、野生型シロイヌナズナ (エコタイプ: コロンビア) のディッピングを行った。種を収穫し、ハイグロマイシンを含む貧栄養培地 BAM 上で発芽させ、ハイグロマイシン耐性を示す約 800 ラインの植物のみを土に移植した。

(4) 表現型スクリーニング

これら約 800 ラインの中から、肉眼による観察で明らかに野生型とは異なる形態、若しくは色素異常を持つラインが約 90 ラインほど選抜された。それら表現型の代表的なものは、植物体歪性化、植物体大型化、植物体色素異常、分枝異常、葉形態異常、花序形態異常、稔性異常などであった。

(5) cDNA の再クローニング

これら表現型の現れた 90 ラインのうち 47 ラインからロゼッタ葉約 2 枚(約 200mgfw)を回収し、ゲノム DNA を抽出した。この DNA に対して PCR 反応を行った。PCR 反応液は以下の組成のものを用い、94℃で 0.5 分、58℃で 0.5 分及び 68℃で 3.5 分を 1 サイクルとして 40 サイクルの条件で反応させた。

反応液組成：

プライマー (100pM)	2×0.5 μ l
dNTP (200 μ l)	5 μ l
バッファー (×10)	5 μ l
ポリメラーゼ	1 μ l
ゲノム DNA	10 μ l
蒸留水	28 μ l

計	50 μ l
---	------------

PCR のためのプライマーは以下の通りである。

GS4: ACATTCTACAACACTACATCTAGAGG (配列番号 1)

GS6: CGGCCGCCCCGGGGAT (配列番号 2)

PCR 産物をアガロースゲル上で回収した後に、pBIG2113SF と混ぜ、SfiI によって完全切断した後にイソプロパノールを用いて沈殿させ、T4 リガーゼを処理後、大腸菌に形質転換した。PCR 断片が挿入されたプラスミドを選抜して、GS4、又は GS6 を用いて挿入されている cDNA 断片の塩基配列を同定した。

(6) FOX ラインに挿入された完全長 cDNA

クローニングが成功した 40 ラインから 43 種類の完全長 cDNA の配列が判明した。表 1 に示すように、これらのうち 42 種類の cDNA はそれぞれ別々の配列を有し、

ベクターのプロモーター直下に挿入されている事が判明した。

表 1

line	fragment number	mips code	annotation
F00521		At5g27150	NHE1 Na ⁺ /H ⁺ exchanger
F00602		At1g08460	hypothetical protein
F00718		At2g20880	AP2 domain transcription factor
F00721		At3g16400	putative lectin
F00732		At5g50700	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like
F00830		At5g54270	Lhcb3 chlorophyll a/b binding protein
F00935		At3g28670	unknown protein
F01022		At1g15820	hypothetical protein
F01027		At4g27170	NWMU4 - 2S albumin 4 precursor
F01049		At4g13930	hydroxymethyltransferase
F01205		At3g43810	calmodulin 7
F01305		At1g62500	putative proline-rich cell wall protein
F01310		At3g25920	50S ribosomal protein L15, chloroplast precursor
F01317	1	At3g60830	Actin like protein
F01325			S-adenosylmethionine decarboxylase
F01407		At5g63850	amino acid transporter AAP4
F01408		At5g59090	cucumisin precursor - like
F01410		At4g35260	NAD ⁺ dependent isocitrate dehydrogenase subunit 1
F02304		At2g45560	putative cytochrome P450
F02318		At1g76180	hypothetical protein(dehydrin like)
F02347		At1g66820	hypothetical protein
F02510		At2g30590	unknown protein
F02607	2	At2g32210	unknown protein
F02623	2	At5g54180	putative protein
F02635	2	At3g01160	hypothetical protein
F02742		At4g00100	putative ribosomal protein S13
F02813		At2g46540	expressed protein
F03039		At5g43560	unknown protein
F03048	3	At2g46280	Eukaryotic translation initiation factor 3 delta subunit
F03124		At2g43100	3-isopropylmalate dehydratase, small subunit
F03142	2	At3g19516	hypothetical protein
F03205		At1g23060	unknown protein
F03208		At2g36970	putative glucosyltransferase
F03209		At5g07990	flavonoid 3'-hydroxylase - like protein
F03213		At3g10020	unknown protein
F03215	1	At3g45140	lipoxygenase ALOX2
F03218	4U	At2g16080	putative protein
F03218	4L	At3g16640	Translationally controlled tumor protein-like protein (TCTP homolog)
F03224	2	At5g56420	putative protein
F03224	3	At2g10940	unknown protein
F03232		At5g47610	putative protein
F23	L	At5g49940	nifU like protein

(7) 表現型の再確認と遺伝子機能の同定

上記のようにしてクローニングされたプラスミドの1つである pBIG03024 は、ペールグリーン（薄緑色）の T1 植物体を示す F03024 ライン(図 2 に示す)からク

ローニングされた約 2.4kb の完全長 cDNA がプロモータの下流にセンス方向に挿入されているプラスミドであった。また、図 3 に示すように、F03024 の T2 植物では、このペールグリーンの性質は 3 対 1 に優性分離した。pBIG03024 をアグロバクテリア GV3101 に形質転換し、FOX 植物作成の時と全く同様にしてディッピング、ハイグロマイシン耐性ラインの選抜、生育を行ったところ 21 ラインのうち 10 ラインから F03024 の T1 ラインと全く同様なペールグリーンの植物が出現した（図 4 に示す）。このことから pBIG03024 に挿入されていた cDNA は植物の緑色色素生産に関連のある遺伝子であることが同定された。

産業上の利用の可能性

本発明のシステムによれば、従来の方法であるアクチベーションタギングのように優性の変異体を得ることができる上、T-DNA 中に組み込まれている、導入された遺伝子が 1 ～ 2 個であるため、過剰発現されている遺伝子を容易に同定し得る。さらに、遺伝子が既に cDNA として単離されているため、新たに原因遺伝子を単離する必要がなく、変異植物から単離したゲノム DNA を用いて容易に原因遺伝子の表現型を再確認及び同定を行うことができる。さらにまた、本発明のシステムによれば、完全長 cDNA さえ整備できれば良いので、cDNA の由来は特定の生物種に限定されず、様々な生物の遺伝子機能解析を行うことができる。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 : 合成 DNA

配列番号 2 : 合成 DNA

請 求 の 範 囲

1. 遺伝子機能の解析方法であって、以下の工程：
 - (a) 発現調節配列を含む完全長 cDNA のライブラリーを植物集団に感染させて該 cDNA を植物に導入し、
 - (b) 前記 cDNA が導入された植物集団から目的の選抜条件に適合する植物を選抜し、
 - (c) 前記選抜された植物から前記 cDNA を単離し、及び
 - (d) 前記単離された cDNA を、前記導入された植物と同種の植物に再導入して前記選抜条件により表現形質を再確認すること、を含む前記解析方法。
2. 発現調節配列が恒常発現型プロモーター、誘導型プロモーター又はこれらの組合せである請求の範囲 1 記載の方法。
3. 完全長 cDNA ライブラリーが、アグロバクテリウムに導入されたものである請求の範囲 1 記載の方法。
4. cDNA の植物への導入が、アグロバクテリウムの感染により行われるものである請求の範囲 1 記載の方法。
5. 選抜条件が、ストレス耐性及び/又は形態形成変異によるものである請求の範囲 1 記載の方法。
6. ストレスが、貧栄養ストレス、乾燥ストレス、温度ストレス、強光ストレス、紫外線ストレス、塩ストレス、大気汚染ストレス、農薬ストレス、酸化ストレス、重金属ストレス、病害ストレス及びホルモンストレスからなる群より選択される少なくとも 1 つである請求の範囲 5 記載の方法。
7. 遺伝子機能の解析システムであって、以下の手段：
 - (a) 発現調節配列を含む完全長 cDNA のライブラリーを植物集団に感染させて該 cDNA を植物に導入する手段、
 - (b) 前記 cDNA が導入された植物集団から目的の選抜条件に適合する植物を選抜する手段、
 - (c) 前記選抜された植物から前記 cDNA を単離する手段、及び
 - (d) 前記単離された cDNA を、前記導入された植物と同種の植物に再導入して前

記選抜条件により表現形質を再確認する手段、
を含む前記解析システム。

８． 発現調節配列が恒常発現型プロモーター、誘導型プロモーター又はこれらの組合せである請求の範囲 ７ 記載のシステム。

９． 完全長 cDNA ライブラリーが、アグロバクテリウムに導入されたものである請求の範囲 ７ 記載のシステム。

１０． cDNA の植物への導入が、アグロバクテリウムの感染により行われるものである請求の範囲 ７ 記載のシステム。

１１． 選抜条件が、ストレス耐性及び/又は形態形成変異によるものである請求の範囲 ７ 記載のシステム。

１２． ストレスが、貧栄養ストレス、乾燥ストレス、温度ストレス、強光ストレス、紫外線ストレス、塩ストレス、大気汚染ストレス、農薬ストレス、酸化ストレス、重金属ストレス、病害ストレス及びホルモンストレスからなる群より選択される少なくとも１つである請求の範囲 １１ 記載のシステム。

１３． 請求の範囲 １～６のいずれかに記載の解析方法により解析された機能を有する遺伝子を含む植物。

１４． 植物体、種子、カルス及びプロトプラストからなる群より選択されるいずれかのものである請求の範囲 １３ 記載の植物。

図1

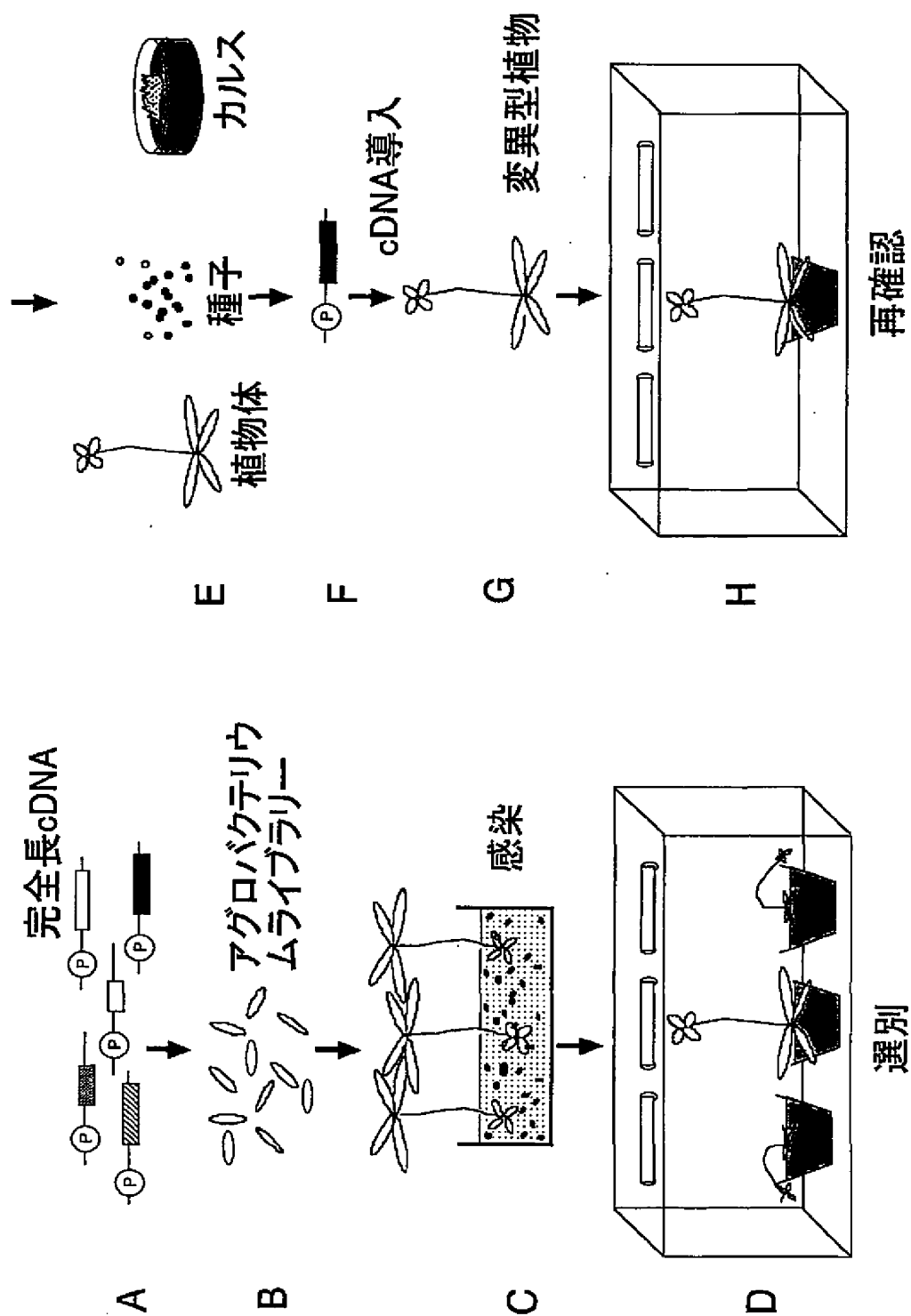


図 2



図 3



図 4



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> A SYNTHETIC GENE FUNCTION-ANALYZING SYSTEM USING
FULL-LENGTH cDNA

<130> RJH14-011T

<150> JP 2001-264156

<151>2001-8-31

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 1

acattctaca actacatcta gagg

24

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 2

cggccgcccc ggggat

16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08739

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/29, C12N15/82, C12N5/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/29, C12N15/82, C12N5/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Seki M., et al., Functional annotation of a full-length Arabidopsis cDNA collection., Science (2002 Apr.), Vol.296, No.5565, pages 141 to 145	1-14
P,X	LeClere S., et al., A library of Arabidopsis 35S-cDNA lines for identifying novel mutants., Plant Mol Biol. (2001 Aug.), Vol.46, No.6, pages 695 to 703	1-14
Y	Weigel D., et al., Activation tagging in Arabidopsis., Plant Physiol. (2000), Vol.122, No. 4, pages 1003 to 1013	1-14
Y	Seki M., et al., High-efficiency cloning of Arabidopsis full-length cDNA by biotinylated CAP trapper., Plant J. (1998), Vol.15, No.5, pages 707 to 720	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 November, 2002 (11.11.02)Date of mailing of the international search report
26 November, 2002 (26.11.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08739

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Carninci P., et al., Balanced-size and long-size cloning of full-length, cap-trapped cDNAs into vectors of the novel lambda-FLC family allows enhanced gene discovery rate and functional analysis., Genomics (2001 Sep.), Vol.77, No. 1-2, pages 79 to 90	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N15/29, C12N15/82, C12N5/14

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N15/29, C12N15/82, C12N5/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JICST (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	Seki M, et. al., Functional annotation of a full-length Arabidopsis cDNA collection., Science(2002 Apr), Vol. 296, No. 5565, p. 141-145	1-14
P X	LeClere S, et.al., A library of Arabidopsis 35S-cDNA lines for identifying novel mutants., Plant Mol Biol. (2001 Aug), Vol. 46, No. 6, p. 695-703	1-14
Y	Weigel D, et.al, Activation tagging in Arabidopsis., Plant Physiol. (2000), Vol. 122, No. 4, p. 1003-1013	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.11.02

国際調査報告の発送日

26.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 美葉子



4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Seki M, et. al., High-efficiency cloning of Arabidopsis full-length cDNA by biotinylated CAP trapper., Plant J. (1998), Vol. 15, No. 5, p. 707-720	1 - 14
A	Carninci P, et. al., Balanced-size and long-size cloning of full-length, cap-trapped cDNAs into vectors of the novel lambda-FLC family allows enhanced gene discovery rate and functional analysis., Genomics (2001 Sep), Vol. 77, No. 1-2, p. 79-90	1 - 14